

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-518167

(P2003-518167A)

(43) 公表日 平成15年6月3日(2003.6.3)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード^{*}(参考)

C 0 8 B 37/00

C 0 8 B 37/00

G 4 C 0 7 6

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/36

4 C 0 8 1

47/38

47/38

4 C 0 9 0

A 6 1 L 31/00

A 6 1 L 31/00

T

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2001-547174(P2001-547174)

(86) (22) 出願日 平成12年12月20日(2000.12.20)

(85) 翻訳文提出日 平成14年6月14日(2002.6.14)

(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 3 5 2 9 0

(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 4 6 2 6 5

(87) 国際公開日 平成13年6月28日(2001.6.28)

(31) 優先権主張番号 0 9 / 4 6 9 , 6 3 8

(32) 優先日 平成11年12月22日(1999.12.22)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ジェンザイム、コーポレーション

GENZYME CORPORATION

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケン

ブリッジ、ワン、ケンダル、スクエア (番

地なし)

(72) 発明者 ベリクルス、キャリアス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、メル

ローズ、スウェインズ、ボンド、アベニュー、39

(72) 発明者 ロバート、ジェイ、ミラー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ハリ

ファックス、フェアウェイ、ドライブ、59

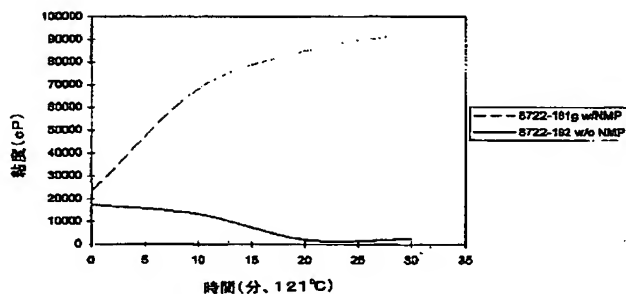
(74) 代理人 弁理士 吉武 賢次 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリアニオン性多糖類の水不溶性誘導体

(57) 【要約】

水に不溶性の生物適合性ゲルを、カルボキシメチルセルロースとカルボジイミドを反応させることによって調製するのであり、反応は低級アルカノール、アルキルピロリドン、DMSOまたはアセトンのような水相溶性の有機溶媒を含む水性媒質で行う。本発明の方法により、反応が通常の方法よりも高濃度のカルボキシメチルセルロースと少ない量のカルボジイミドを含むようにすることができる。



【特許請求の範囲】**【請求項1】**

水相溶性有機溶媒を含む水溶液中においてポリアニオン性多糖類を活性剤と反応させることを含んでなる、水不溶性の生物適合性ゲルの製造方法。

【請求項2】

該溶媒が、低級アルカノール、アルキルピロリドン、DMSOおよびアセトンからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ポリアニオン性多糖類が、ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、カルボキシメチルキトサン、コンドロイチン-6-サルフェート、デルマチンサルフェート、ヘパリン、およびヘパリンサルフェートからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ポリアニオン性多糖類がヒアルロン酸である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

ポリアニオン性多糖類がカルボキシメチルセルロースである、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

活性剤がカルボジイミドを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記カルボジイミドが、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、または1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオダイドを含んでなる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

該溶媒が低級アルカノールである、請求項2に記載の方法。

【請求項9】

該溶媒が、エタノールまたはイソプロパノールである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

該溶媒がアルキルピロリドンである、請求項2に記載の方法。

【請求項11】

該溶媒がN-メチルピロリドンである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

該溶媒がDMSOである、請求項2に記載の方法。

【請求項13】

該溶媒がアセトンである、請求項2に記載の方法。

【請求項14】

溶液中における該溶媒の濃度が、約5重量%～約8重量%の範囲である、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

ポリアニオン性多糖類が0.2M～2.0Mの濃度範囲で含まれている、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

pH4.0～5.0において実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

上記ポリアニオン性多糖類のカルボキシル基対上記活性剤のモル比が約1:1未満である、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

上記ポリアニオン性多糖類のカルボキシル基対上記活性剤のモル比が約1:4未満である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

請求項4または5に記載の方法に準じて調製される、水不溶性の生物適合性ゲル。

【請求項20】

該ゲル中に分散された薬学活性物質をさらに含んでなる、請求項19に記載のゲル。

【請求項21】

薬学活性物質が、増殖因子、酵素、薬剤、バイオポリマー、および生物適合性

の合成ポリマーからなる群より選択される、請求項20に記載のゲル。

【請求項22】

手術後の治癒過程に、分離される組織間の位置に請求項19に記載の水不溶性の生物適合性ゲルを挿入することを含んでなる、術後癒着を防止する方法。

【請求項23】

侵襲を最小限にする外科手術の手順中に、ラプロスコープ装置(laprosopic instrument)を用いてゲルを組織間の位置に挿入する、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、化学修飾されたポリアニオン性多糖類から形成された生物適合性フィルムおよびゲルに関する。特に、本発明は、水と、低級アルカノール、アルキルピロリドン、DMSOまたはアセトンなどの水に相溶性の溶媒とを含む混合溶媒系でポリマーを合成することによって調製される生物適合性のポリマー性ゲルに関する。

【0002】

背景技術

ポリアニオン性多糖類は、約4.0を上回るpH値で2個以上の負に帯電した基、例えば、カルボキシル基を含む多糖類である。一つのこのようなポリアニオン性多糖類であるヒアルロン酸（「HA」）は、例えば、滑液、ガラス体液、血管壁および臍帯、および他の結合組織中に見られる天然に存在するムコ多糖類である。この多糖類は、交互に現れるN-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸残基が交互に現れる β 1-3グルクロニドおよび β 1-4グルコサミニド結合によって結合されているものからなり、反復単位は $-(1\rightarrow4)-\beta-D-GlcA-(1\rightarrow3)-\beta-D-GlcNAc-$ となる。水中では、ヒアルロン酸は溶解して、極めて粘稠な流体を形成する。天然供給源から単離されたヒアルロン酸の分子量は、 $5\times 10^4 \sim 1\times 10^7$ ダルトンの範囲内にある。

【0003】

本明細書で用いられる「HA」という用語は、ヒアルロン酸、および例えば、ヒアルロン酸ナトリウム（ナトリウム塩）、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸マグネシウム、およびヒアルロン酸カルシウムなどのヒアルロン酸塩のいずれかを意味する。

【0004】

化学修飾した（「誘導体形成した」）形態のHAは、外科手術助剤として有用であり、術後期間中に体組織の癒着または融合を防止する。誘導体形成したHA

ゲルまたはフィルムを、分離したままにして相互の癒着を阻害するようにした組織間の位置に注入または挿入する。効果的であるようにするには、ゲルが最終的に分散して組織が接触するときには、それらも最早癒着する傾向を持たないように、ゲルを適切な位置に留まらせ、組織の接触を十分な長時間防止しなければならない。

【0005】

化学修飾したHAは、徐放薬剤送達にも用いることができる。Balazs et al., 1986, 米国特許第4,582,865号明細書には、「HAの架橋ゲルは、その中に分散されているがゲルの高分子マトリックスに共有結合していない低分子量物質の放出を遅らせることができる」ことが記載されている。T. J. Roseman et al., 「制御放出送達系 (Controlled Release Delivery Systems)」, (1983, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク) 中で、R. V. Sparer et al. は 第6章, 107-119頁において、エステル結合を介する、直接的または中間結合基としてアラニンブリッジを含むエステル複合体でのヒアルロン酸に共有結合したクロラムフェニコールの徐放を記載している。

【0006】

I. Danishefsky et al. (1971), Carbohydrate Res., Vol. 16, p. 199-205は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(「EDC」)の水溶液の存在下でムコ多糖類アミノ酸エステルと反応させることによりムコ多糖類のカルボキシル基を置換アミドに転換することによるムコ多糖類の修飾を記載している。彼らは、グリシンメチルエステルをHAなどの様々な多糖類と反応させた。生成する生成物は水溶性であり、すなわちそれらは水または体組織間で見られるような水性環境に速やかに分散する。

【0007】

HA組成物の水溶性を少なくするための提案としては、HAの架橋が挙げられる。T. J. Roseman et al., 「制御放出送達系 (Controlled Release Delivery Systems)」, (1983, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク) 中で、R. V. Sparer et al. は 第6章, 107-119頁において、HAにアミド結合を介してシステイン残基を結合させた後、システイン修飾したHAを結合したシステイン残基間でジス

ルフィド結合を形成することによって架橋させることによるHAの修飾を記載している。システイン修飾したHAはそれ自身は水溶性であり、酸化によって架橋してジスルフィド形態になったときにのみ水不溶性となった。

【0008】

De Belder et al. のPCT公報第WO86/00912号には、二または多官能価エポキシドを有するカルボキシル含有多糖類の架橋によって調製した術後の組織癒着を防止するための低速分解性ゲルが記載されている。水溶性が減少したHAの架橋ゲルを調製する目的で提案されている他の反応性の二または多官能価試薬としては、50℃でのアルカリ性媒質中の1, 2, 3, 4-ジエポキシブタン(T. C. Laurent et al., 1964, Acta Chem. Scand., vol. 18, page 274)、アルカリ性媒質中のジビニルスルホン(E. A. Balasz et al., 米国特許第4, 582, 865号明細書(1986))、およびホルムアルデヒド、ジメチロール尿素、ジメチロールエチレン尿素、エチレンオキシド、ポリアジリジン、およびポリイソシアネートなど様々な他の試薬(E. A. Balasz et al., 英国特許出願第84 205 60号明細書(1984年))が挙げられる。T. Malson et al., 1986, PCT公表第86/00079号明細書には、HAを二または多官能価エポキシドのような二または多官能価架橋試薬と反応させることによるガラス体液代替物として用いるためのHAの架橋ゲルの調製が記載されている。T. Malson et al., 1986, EPO0 193 510号明細書には、架橋HAゲルの真空乾燥または圧縮による成型品の調製が記載されている。

【0009】

【発明の概要】

本発明は、ゲルを形成するのに十分な条件下でポリアニオン性多糖類と活性剤とを組み合わせることによって水不溶性ゲルを調製するための改良法を特徴とする。本発明の反応条件は、低級アルカノール、アルキルピロリドン、DMSOおよびアセトンからなる群より選択される有機溶媒の使用を包含する。本発明の有機溶媒は水不溶性であり、約5.0重量%～約80重量%の量で反応媒質に含まれている。特に好ましい有機溶媒は、N-メチルピロリドンであり、一般にカルボジイミド活性剤と相溶性である。N-メチルピロリドンは他の有機溶媒と比較し

て好ましい生物適合性プロフィールを有し（ラットLD₅₀ = 4 g/Kg）、低粘度を有する修飾したポリアニオン性多糖類を高濃度で得るのに用いることができる。

【0010】

本明細書に記載されているように、反応媒質中で水溶性有機溶媒を用いることにより、水のみで行った同様の反応と比較して実質的に少ない量の活性剤を用い且つ反応物の濃度を有意に増加させて、ポリアニオン性多糖類を合成することができる。反応物の濃度の増加は6倍以上になることができ、活性剤、例えば、カルボジイミドの減少は1/3以上のオーダーであることができる。例えば、N-メチルピロリドンを用いると、N-メチルピロリドンを用いない場合の反応溶液の濃度が0.6%（6 g/L）であり且つ収率が64%であるのと比較して、反応濃度を4.0%（40 g/L）程度とし、収率を82%までとすることができる。カルボジイミドは比較的高価な試薬であるので、この程度のカルボジイミド使用量の減少によりかなりコスト削減を行うことができる。典型的には、誘導体形成反応には、カルボキシ基1モル当たり約6モル当量のEDCを用いる必要があり、多量のエタノールを必要とする沈澱工程を含む。多量のエタノールを用いる必要がある次の精製手続きにおけるエタノール沈澱の使用は、本発明の手続きに従うことによって除くことができる。

【0011】

本発明で用いる好ましいポリアニオン性多糖類としては、ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース（「CMC」）、カルボキシメチルアミロース（「CMA」）、カルボキシメチルキトサン、コンドロイチンサルフェート、デルマチンサルフェート、ヘパリン、およびヘパリンサルフェートが挙げられ、CMCおよびCMAが特に好ましい。

【0012】

好ましい活性剤は、カルボジイミド、例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドまたは1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドメチオダイドである。

【0013】

活性剤はポリアニオン性多糖類に加えることができ、またはポリアニオン性多糖類を活性剤と組合わせてもよい。異なるポリアニオン性多糖類の組合せを用いることもできる。

【0014】

反応を行うための好ましいpHは、4.0～5.0である。該多糖類の好ましい濃度は、0.2M～0.2Mである。多糖類のカルボキシル基対活性剤のモル比は、好ましくは約1：1未満であり、更に好ましくは約1：6未満である。

【0015】

ゲルは、癒着防止組成物の形態で、例えば、侵襲を最小限にする外科手術の手順で用いる注射器またはラプロスコープ装置(laprosopic instrument)で配合に適する組成物の形態で提供することができる。ゲルは、この中に分散された薬学活性物質を含むこともでき、このような場合には、ゲルは薬剤送達系として有用である。適当な物質としては、増殖因子、酵素、薬剤、バイオポリマー、および生物適合性の合成ポリマーが挙げられる。あるいは、ゲルは、内皮細胞の損傷を最小限にする目的で眼科手術における混濁部の除去のための水晶体超音波吸引術のような粘弾性補足物が所望な用途で用いることができる。

【0016】

本明細書で用いられる用語としての「生物適合性」物質は、生物学的機能に対して医学上許容できない毒性または有害な作用を示さないものである。適当な活性剤と反応するポリアニオン性多糖類は、二または多官能価架橋試薬を用いおよび別個に添加することなく水溶性を減少させるゲルを形成する。

【0017】

本発明の「水に不溶性の」ゲルは、この用語および類似の用語が本明細書で用いられているように、本発明によって修飾され、同じ大きさ(the same dimensions)を有し、20℃で蒸留水50mlのピーカー中で攪拌せずに同様に放置したポリアニオン性多糖類の1%水溶液を用いて形成したものであり、20分後にも構造は完全なままであり、24時間後にはゲルは膨潤するが、ゲル境界および縁は未だに存在している。

【0018】

ポリアニオン性多糖類は、ポリアニオン性多糖類上のカルボキシル基を親核攻撃に弱くするやり方で水性混合物中で処理するとき、本明細書で「活性化」されるという用語が用いられているように、「活性化」されるといわれており、「活性剤」はポリアニオン性多糖類を含む水性混合物中で、ポリアニオン性多糖類がこのように活性化されるようにする物質である。

【0019】

ゲルは水に不溶性であるので、それらは使用前に水で十分に洗浄して、未反応物質を除去することができる。更に、ゲルは、使用前にゲルのレオロジー特性を著しく変化させることなく熱処理によって最終的に安定化することもできる。

【0020】

本発明のゲルは、反応混合物に色素または着色剤を含めることによって着色形態で調製することもできる。このような着色ゲルは、本来の位置にあるときまたは配置中に無色のものよりも容易に視界に捕らえ、外科的手続き中の処理を一層容易にすることができる。

【0021】

本発明のゲルは、水和されたときにでもそれらの強度を保持している。ゲルは縫合の必要なしに生物学的組織に癒着するので、術後の癒着防止材料として有用である。ゲルは、出血の存在下でも組織に適用することができる。

【0022】

本発明の他の特徴および利点は、下記の本発明の好ましい態様の説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0023】

【発明の具体的な説明】

本発明のゲルは、一般に下記のようにして調製される。CMCを水に溶解して水溶液を形成させた後、低級アルカノール、アルキルピロリドン、DMSOおよびアセトンからなる群より選択される溶媒を加える。好ましい低級アルカノールは、エタノールまたはイソプロパノールであり、好ましいアルキルピロリドンはN-メチルピロリドンである。CMCは、様々な商業的供給源から得ることができる。好ましくは、CMCの濃度範囲は、約0.1～約8.0重量/重量（「w

／w)) %である。より高い濃度は、粘度を著しく増加させることなく達成することができる。水性混合物のpHを下向きに調節した後、溶解したCMCを適当な活性剤を混合することによって活性化し、所望なゲルが形成されるまで放置する。

【0024】

試薬の濃度を増加させることは、一般的に反応速度を増加させる効果を有する。しかしながら、水溶性カルボジイミドを反応に用いるときには、重大な欠点である水との競合的加水分解反応がある。カルボジイミド-ポリマー接合体が形成されると、水は所望な変換と競合し、接合体を尿素副生成物と未修飾ポリマーとに開裂させることができる。水の量を（適当な有機溶媒に置換えることによって）減少させると、競合的加水分解反応が遅くなり、一層多量の生成物が形成する。

【0025】

水性CMC混合物は酸性であり、好ましくはpHをpH4.0～pH5.0とし、更に好ましくはpH4.3～pH4.75とすべきである。これより低いpH値では、好ましい活性剤であるEDCが不安定であり、高い値では、反応速度が減少する。塩酸を加えてpHを調節するのが好ましいが、他の既知の酸を用いることもできる。好ましい多糖類濃度は、一般に0.2M～2.0Mの範囲である。多糖類のカルボキシル基対活性剤の好ましいモル比は約1：1未満であり、更に好ましくは約1：6未満である。

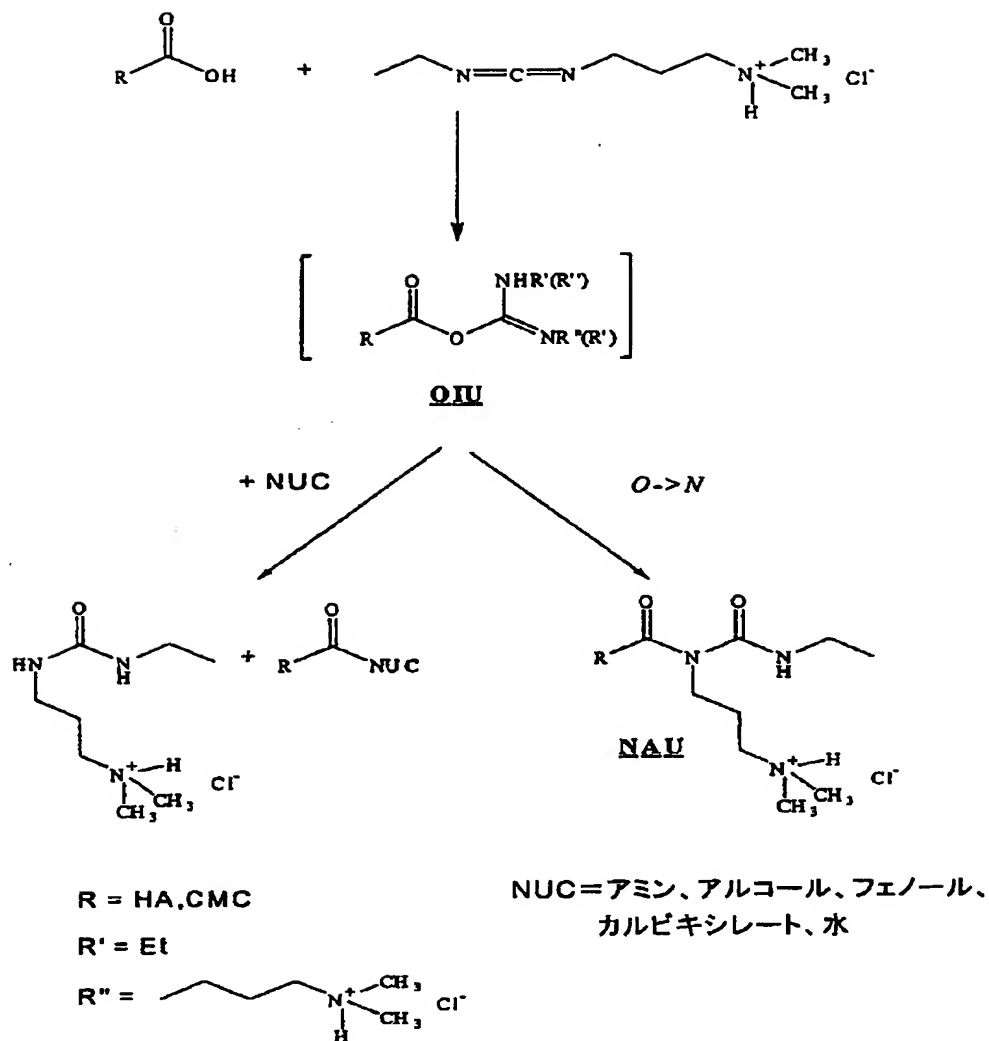
【0026】

水性CMC混合物のpHを調節したならば、活性剤を混合する。好ましい活性剤としては、カルボジイミドが挙げられ、最も好ましくはEDC（幾つかの文献では、この物質は1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチル-カルボジイミドまたは「DEC」と呼ばれる）またはETC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドメチオダイド）である。

【0027】

カルボジイミドとカルボン酸との反応の機構を、下記に示す。

【化1】



【0028】

反応は、添加された親核試薬（すなわち、アミン）と親核置換を行うかまたは $\text{O} \rightarrow \text{N}$ 転位を行い更に安定な N -アシル尿素（「 NAU 」）を生じることが出来る O -アシルイソ尿素（「 OIU 」）中間体を通して進行する。水性反応の場合には、水が OIU 中間体を加水分解する結果、カルボキシル基の誘導体形成は極めて低くなる。従って、水中でのジイミドとカルボキシル基の反応には、大過剰のジイミド試薬を必要とする。

【0029】

この問題は、水含量を有機溶媒、好ましくは極性の非プロトン性溶媒で希釈することによって、競合的加水分解を減少することによって解決されている。この手順を用いれば、 N -メチピロリドン：水の 1：1 混合物の 4.0%（40 g/L

）溶液を処方することができる。水含量の減少並びに高ポリマー濃度により、ゲルを形成するのに必要なカルボジイミドの量は1／3に減少する。反応混合物にEDCを加えた後のこの手続きに続く数分間でゲル沈澱が形成することは、驚くべきことである。

【0030】

ゲルはポリエチレンメッシュスクリーンを用いて単離し、過剰の試薬と副生成物は水で連続して洗浄することによって除去することができる。これにより、修飾した材料を単離するのに大容量のエタノールを用いる必要がなくなる。単離したゲルは、適当な緩衝液と高剪断混合することによって所望の粘度に処方し、注射器に包装し、最終的にオートクレーブで滅菌することができる。ゲルは極めて強固であり、熱処理にも耐えて、レオロジー特性の変化は最小限である。

【0031】

着色生成物が所望の場合には、「クマシ(商標)ブリリアントブルー R-250 (Coomassie™ Brilliant Blue R-250)」としても知られ、Serva 社から「セルバブルー (Serva Blue)」として発売されている青色色素「ブリリアントブルー R (Brilliant Blue R)」のような色素または着色剤の溶液を、この時点で反応混合物に混合することができる。得られる生成物は体組織の色と明確に識別することができる青色を有し、外科手術中にゲルを処理し、定位置にあることを容易に確認できる。

【0032】

試薬(およびもしある場合には、着色剤または色素)を混合してしまったならば、反応混合物を一定時間放置するだけでよく、またはこれを連続的にまたは時折攪拌し、またはかき混ぜることができる。

【0033】

試薬を混合すると、pHが上昇し、反応の進行に従って酸を加えることによって所望のpHに保持することができる。しかしながら、本発明者らは、様々な所望な物理特性を有するゲルを、反応が進行するにつれて単にpHを上昇させることによって得ることができることを見いだした。

【0034】

生成するゲルは、エタノール、イソプロパノール、アセトンのような高価で且つ有害な可能性のある溶媒、およびポリマーを水溶液から沈澱させる可能性のある他の溶媒を使用せずに回収することができる。これは、ゲルを反応混合物から沈澱させ、ゲルを濾過によって回収することによって行う。回収したゲルを水で洗浄し、所望のレオロジー特性が得られるように処方した後、最後にゲル特性を明らかに変化させることなく熱滅菌する。

【0035】

必要に応じて、ゲルを、使用前に、例えば水または1M塩化ナトリウム水溶液で灌流することによって洗浄することができる。あるいは、反応混合物を透析して、これをフィルムとして流延する前に残留試薬を除去することができる。ゲルを治療用途に用いようとする場合には、洗浄を行って残留試薬または置換尿素のような試薬に由来する材料を除去するのが望ましい。上記のようにブリリアントブルーRで青色着色したゲルは、このような洗浄中にその着色を失わない。試薬または反応生成物の除去は、高圧液体クロマトグラフィーによって観察することができる。

【0036】

【実施例】

本発明を、下記の例で更に詳細に説明する。これらの例は例示のためにのみ提供されるのであり、特許請求の範囲における記載を除き本発明を制限しようとするものではない。当業者であれば、本発明のゲルは、本発明の方法の範囲内にあるが詳細は本明細書に記載のものと異なるプロトコールを用いて作成することができることを理解するであろう。

【0037】

例1

この例では、活性剤としてEDCおよび親核試薬としてロイシンメチルエステル-5-塩酸塩を用いて、ゲルを調製した。

分子量が $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ のヒアルロン酸ナトリウム(400mg、カルボキシル基1.0ミリモル)を、蒸留水10mlに溶解した。水溶液のpHを、0.1N HClを加えることによってpH4.75に調節した。次に、EDC3

14 mg (1.64ミリモル)を全量を一度に加えた後、L-ロイシンメチルエステル塩酸塩190 mg (1.05ミリモル)を加えた。次に、反応混合物のpHを、2時間かけて6.2まで上昇させた。反応混合物を5時間室温に保持した後、濃厚な不溶性ゲルを形成した。このゲルは、1M NaCl溶液で洗浄してその物理特性を失うことなく残留試薬を除去することができた。

【0038】

例2

この例では、様々なEDC/ロイシン:HAの比を用いて、ゲル処方物および特性を比較した。

手順は、ヒアルロン酸ナトリウム(400 mg; カルボキシル基1.0ミリモル)を水15 mlに溶解したものをを用いて、例1の通りとした。別の実験では、次に、下記の量のEDCおよびロイシンメチルエステル塩酸塩を加えた: 153 mg EDC (0.8ミリモル) / 182 mg ロイシンメチルエステル塩酸塩 (1.0ミリモル); 76 mg EDC (0.4ミリモル) / 90 mg ロイシンメチルエステル塩酸塩 (0.5ミリモル); および38 mg EDC (0.2ミリモル) / 45 mg ロイシンメチルエステル塩酸塩 (0.25ミリモル)。EDCとロイシンメチルエステル塩酸塩との最も高い比については、例1と同様に強いゲルが得られた。最も低い比の反応物では(0.2ミリモル/0.25ミリモル~1.0ミリモルHAカルボキシル基)、弱いゲルが得られ、2週間後には崩壊して流体となった。

【0039】

例3

この例では、HA濃度を1/2に減少して、生成するゲル特性を比較した。

手順は、HA(400 mg、カルボキシル基1.0ミリモル)を水15 mlよりもむしろ30 mlに溶解したことを除き(1-1/3%w/wHA)、例1と同様であった。ゲルが形成されたが、これは例1で得たものより弱かった。

【0040】

例4

この例では、活性剤としてEDCおよび親核試薬としてロイシンメチルエステル塩酸塩を用いて、フィルムを調製した。

ヒアルロン酸ナトリウム(400mg、カルボキシル基1.0ミリモル)を、蒸留水40mlに溶解した。0.1N HClを加えて、溶液のpHをpH4.75に調節した。次に、EDC(314mg、1.64ミリモル)を一度に加えた後、L-ロイシンメチルエステル塩酸塩190mg(1.05ミリモル)を加えた。反応混合物のpHを2時間中に6.2まで上昇させた後、面積が6360mm²のペトリ皿に溶液を空けて、2日間かけて乾燥してフィルムとした。この方法で生成したフィルムは強固で且つ水および1M NaCl水溶液に不溶性であった。フィルムは、例1と同様に水またはNaCl水溶液で洗浄して、その物理特性を喪失することなく残留試薬を除去することができた。このようなフィルムの赤外分光光度分析では、約2130cm⁻¹にカルボジイミドの吸収は示さず、約1740cm⁻¹、1700cm⁻¹、1650cm⁻¹および1550cm⁻¹に吸収を示した。

【0041】

例5

この例では、様々なHA濃度を用いてフィルムを作成し、生成するフィルム特性を比較した。

例4に記載の手順を、HA(400mg、カルボキシル基1.0ミリモル)を蒸留水30ml、40ml、または100mlに溶解することによって作成した3種類の異なる初期HA濃度を用いて繰返した。これらの初期濃度のHAのそれぞれを用いて製造したフィルムは強固であり且つ水および1M NaCl水溶液に不溶性であり、ある濃度範囲のHAを用いることができることを示していた。これらのフィルムのそれぞれは、その物理特性を喪失することなく水またはNaCl水溶液で洗浄することができた。

【0042】

例6

この例は、流延してフィルムを成形する前の反応混合物の透析の効果を、フィルムを成形した後のこれらの洗浄と比較して説明した。

ヒアルロン酸ナトリウム(400mg/水40ml)、EDC(314mg、1.64ミリモル)およびL-ロイシンメチルエステル塩酸塩(190mg、1.05ミリモル)を、例4と同様に反応させた。反応が完了したならば(2時間)、反応混合物

を12,000NMWカットオフ透析チューブを介して水に対して透析して、残留試薬を除去した。次に、透析混合物を、例4と同様にしてフィルムとして流延した。このようにして得られたフィルムは強固であり、水または1M NaCl水溶液に不溶性であった。

【0043】

例7

この例では、一層高濃度で空けた反応混合物を乾燥することによってフィルムを形成させ、様々な表面積／容積で混合物を乾燥することによって製造したフィルムの特性を比較した。

例4と同様にして得られた反応混合物(反応容積40ml)を、小さなペトリ皿(面積3330mm²)に流延した。このようにして得られたフィルムは、1M NaCl水溶液および水に不溶性であった(100℃、1時間)。

【0044】

例8

この例では、他のアミノ酸エステルおよびEDCで活性化したHAを用いて、フィルムを調製した。

HAの溶液(400mg/H₂O 40ml)を、0.1N HClを用いてpH4.7にした。次に、EDC(314mg、1.6ミリモル)を全量を一度に加えた後、アミノ酸誘導体1ミリモルを加えた。反応混合物をペトリ皿に空けて乾燥させた。L-バリンメチルエステル塩酸塩、L-イソロイシンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩、およびL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩から、不溶性フィルムを得た。

【0045】

例9

この例では、単純な第一アミン(アラニン)を親核試薬として用いて、フィルムを調製した。

HAの溶液(400mg/H₂O 40ml)を、0.1N HClを用いてpH4.7にした。次に、EDC(314mg、1.6ミリモル)を全量を一度に加えた後、アラニン1ミリモルを加えた。反応混合物をペトリ皿に空けて乾燥させ、

不溶性フィルムを得た。

【0046】

例10

この例では、フィルムを他のロイシンのエステルを用いて調製した。

HAの溶液(400mg/H₂O 40ml)を、0.1N HClを用いてpH 4.7とした。次に、EDC(314mg、1.6ミリモル)を全量を一度に加えた後、ロイシンエステル1ミリモルを加えた。反応混合物をペトリ皿に空けて、乾燥した。不溶性フィルムが、L-ロイシンエチルエステル塩酸塩およびL-ロイシン第三ブチルエステル塩酸塩のいずれからも得られた。

【0047】

例11

この例では、他のアミノ酸メチルエステルを用いて、ゲルを調製した。

HAの溶液(400mg/H₂O 15ml)をpH 4.7にし、EDC(314mg; 1.6ミリモル)を加えた後、アミノ酸誘導体(1ミリモル)を加えた。反応混合物は、5～24時間以内に濃厚なゲルを形成した。水に不溶性のゲルを、L-バリンメチルエステル塩酸塩、L-イソロイシンメチルエステル塩酸塩、L-アルギニンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩、およびL-ヒスチジンメチルエステル塩酸塩を用いて得た。

【0048】

例12

この例では、アミノ酸アミド(ロイシンアミド)を親核試薬として用いて、フィルムを調製した。

HAの溶液(400mg/H₂O 40ml)を、0.1N HClを用いてpH 4.7とした。次に、EDC(314mg; 1.6ミリモル)を全量を一度に加えた後、L-ロイシンアミド塩酸塩1ミリモルを加えた。反応混合物をペトリ皿に空けて乾燥させ、不溶性フィルムを得た。

【0049】

例13

この例では、ロイシンエチルエステル塩酸塩を用いて、ゲルを調製した。

HAの溶液(400mg/H₂O 15ml)をpH4.7にし、EDC(314mg、1.6ミリモル)を加えた後、ロイシンエチルエステル塩酸塩(1.0ミリモル)を加えた。混合物は、5～24時間以内に濃厚な水に不溶性のゲルを形成した。

【0050】

例14

この例では、ETCをHA 活性剤として用いて、フィルムおよびゲルを調製した。

分子量が $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ ダルトンの範囲内のヒアルロン酸ナトリウム(400mg、カルボキシル基1.0ミリモル)を、水(10mlおよび30ml)に溶解した。それぞれの水溶液のpHを、0.1N HClを添加することによってpH4.75に調節した。次に、ETC475mg(1.6ミリモル)を全量を一度に加えた後、L-ロイシンメチルエステル塩酸塩190mg(1.05ミリモル)を加えた。この反応混合物のpHを、次の2時間かけてpH6.2まで上昇させた。水10mlを含む反応混合物は、不溶性ゲルを形成した。水30mlを含む反応混合物は、乾燥後に不溶性フィルムを生じた。

【0051】

例15

この例では、着色フィルムの調製を例示する。

【0052】

HAの溶液(400mg/H₂O 30ml)を例13と同様にしてpH4.75にした後、ETC(475mg、1.6ミリモル)とロイシンメチルエステル塩酸塩(190mg、1.05ミリモル)を加えた。次に、「セルバブルー (Serva Blue)」色素(5mg/ml)をH₂O(0.5ml)に溶解した希薄溶液を、反応混合物に加えた。反応混合物をペトリ皿に空けて、水に不溶性の青色フィルムを16時間後に得た。フィルムを1M NaClに続いてH₂Oで洗浄したとき、フィルムは青色を保持した。

【0053】

例16

この例では、化学修飾したHAのフィルムの組織の生物適合性を例示する。

例4に記載の手順に準じて調製した4片のフィルムと2片の米国薬局方のネガティブコントロールを、ホワイトニュージールランドウサギ（試験当たり2匹）の脊椎傍筋に外科手術によって移植した。試験部位を、72時間後に肉眼によりまたは7日後に完全な組織病理学により評価した。米国薬局方XXI, 1237頁によれば、試験材料はプラスチック材料の評価のための米国薬局方の移植試験の要件に適合した。

【0054】

例17

この例では、リシン修飾HAの調製を例示する。

0.4% (w/w) HA水溶液を調製した。この溶液のpHを、酸を添加することによって4.3~4.75に調節した。この溶液のそれぞれ100mlに、EDC 0.76gをEDCが完全に溶解するまで攪拌しながら加えた。HA/EDC溶液のそれぞれ100mlに、リシンメチルエステル(LME)をLMEが完全に溶解するまで攪拌しながら加えた。HA、EDCおよびLMEの添加は室温で行い、最終的なHA/EDC/LME溶液が形成したならば、必要になるまで4℃で保管した。

【0055】

LME修飾したHA材料は、最終用途によって様々な形状、大きさおよび粘稠度に加工することができる。薄いシート状の材料が所望ならば、混合物を平らな表面上に空けることができる。次に、水を周囲温度または高温で蒸発させることによって、この材料を固体にすることができる。シート状材料を製造する代替法は、材料に凍結乾燥を施すことである。最終生成物の細孔度は、初期凍結温度を調節することによって制御することができる。湾曲した表面および他の形状は、最初にゲルをネガ画像表面に流延した後、上記のように加工することによって同様の方法で製造することができる。乾燥したシートは、所望ならば、Carver実験室プレスで規定された厚みまでプレスすることによって更に加工することができる。これは、空隙が限定されている解剖学的構造間に薄いフィルム置く必要がある用途に特に有用である。

【0056】

標準食塩水で再水和した凍結乾燥材料の機械試験では、破断までの力の値 (force-to-break values) は170～900 g/cm² となった。この材料の破断時伸び値は33%～62%であった。

【0057】

例18

この例では、CMC修飾したHAの調製を例示する。

HA (0.4% (w/w), 0.01M)、および分子量が250,000であり且つ置換度が0.65～0.90 (0.19% (w/w), 0.01M) の範囲であるアクアロン (Aqualon) 型CMCを、水溶液中で室温にて混合した。混合物のpHを、1M

HClを加えることによってpH4.7～4.8に調節して、保持した。この溶液のそれぞれ100mlに、EDC 0.67g (0.04M) を加えた。EDCとの反応中に、溶液のpHを0.1M HClを加えることによってpH4.7～4.8に保持し、反応を1時間進行させ、その間に沈澱を形成した。未反応EDCを、酸性にした水 (pH4.0) に対して24時間透析し、3および19時間目に2回透析物を交換することによって、沈澱から除去した。次に、HA/CMCスラリーを平らな鋳型に流延し、室温にて24時間風乾した。

【0058】

HA/CMC膜は、実験動物モデルでの術後癒着形成の発生率を減少させることが示された。ラット盲腸剥離モデルを用いる実験では、HA/CMC膜を外科手術によって剥離したラット盲腸の周囲に配置したが、これまでの研究は、制御されたやり方で剥離されたラットの盲腸に癒着が容易に形成することを示していた。HA/CMC膜またはORC膜 (癒着防止の目的でJohnson & Johnsonから発売されているInterceed TC7膜) を収容した動物群における盲腸癒着を、盲腸を剥離したが膜を全く収容しなかった動物での癒着コントロールと比較した。これらの実験の結果は、HA/CMC膜が、コントロール動物およびInterceed TC7フィルムを収容した動物と比較して、癒着形成を一貫して減少させることを示した。

【0059】

例19

この例では、EDCによって活性化したHAの調製を例示する。

HA (1.0×10^6 ダルトン) を水に溶解して、25℃で一晩攪拌することによって0.8% (w/w) 溶液を調製した。反応混合物のpHを、0.1N HClでpH4.75に調節した。EDC (EDC対HAのモル比4:1, 1.53% (w/v) 最終濃度) を連続攪拌しながらこの溶液に加え、更に0.1N HClを加えて1時間一定pH(4.7~5.1)に保持した。未反応EDCおよび他の低分子量不純物は、標準的方法を用いる分子量分粒、透析、または透析濾過によって除去した。この工程の後に、水に不溶性の透明ゲルが得られた。

【0060】

例20

この例では、水溶性溶媒を用いるEDCで活性化したHAの分別沈澱の効果を例示する。

未反応EDCおよび低分子量不純物を適当な水溶性溶媒 (例えば、C1~C3 アルコール、アセトン) を用いる分別沈澱によって除去したことを除き、例19に記載の手順を繰返した。これらの条件下では、水に不溶性の繊維が生成した。

【0061】

例21

この例では、EDCで活性化したCMCの調製を例示する。

CMC (250×10^6 ダルトン) を水に溶解して、室内周囲温度 (22~25℃) で一晩攪拌することによって0.8% (w/v) 溶液を調製した。反応混合物のpHを、0.1N HClでpH4.75に調節した。EDC (EDC対CMCのモル比4:1, 1.53% (w/v) 最終濃度) を一定攪拌を行いながらこの溶液に加え、更に0.1N HClを加えることによってpHを4.70~5.10の間に1時間保持した。未反応EDCおよび他の低分子量不純物は、分粒クロマトグラフィー、透析、透析濾過、または適当な水溶性溶媒 (例えば、C₁~C₃ アルコール、アセトン) を用いるCMCの分別沈澱を用いて除去した。長さが約300~800 μmであり、幅が10~20 μmの水に不溶性の繊維がこれらの反応条件から生成した。

【0062】

例22

この例では、EDCで活性化したHAとEDCで活性化したCMCとのブレンドの調製を例示する。

EDCで活性化したHAおよびCMCは、例19および21に記載の方法で個別に調製したが、それぞれの反応生成物は混合前に精製しなかった。活性化HA 300mlおよび活性化CMC 300mlを1000mlビーカーに入れ、Turraxブランドのブレンダーで25℃で6000rpmで10分間混合した。生成する混合物を、pH4.0の水に対して20:1の比で24時間3回透析物を交換しながら透析することによって精製した。透析後に、混合物を平らな鋳型に空けて、風乾し、薄い水に不溶性のフィルムとした。混合物における繊維の品質は、互いに混合した活性化CMCと活性化HAの相対量を変化させることによって制御することができる。

【0063】

例23

この例では、N-メチル-2-ピロリドン中でのEDCで活性化したCMC組成物の調製を例示する。

CMCを水に溶解して、0.8% (w/v) 溶液を調製した。この溶液150mlをN-メチル-2-ピロリドン(「NMP」)150mlと混合した後、周囲温度で20分間攪拌した。6N HCl 6.0mlをこの溶液に加えた後、EDC 14.75gを脱イオン水(D.I. water)15.0mlに溶解したものを加えた。EDC溶液を加えると、反応は直ちにゲル粒子を形成した。

【0064】

スラリーを室温で10分間放置し、その時点で沈澱をメッシュフィルターに回収し、脱イオン水それぞれ1リットルで3回連続して洗浄した。生成するゲル粒子を、緩衝剤または食塩水溶液に分散させ、高剪断ミキサー(IKA-Labortechnik ultra Torax, T25型)を用いて粘度が変化しなくなるまでホモジナイズした。

次に、ゲルを20ml注射器(B-D Hypak)に満たし、特別製注射器ホルダーで121℃にて15分間オートクレーブ処理を行った。あるいは、ゲル粒子をエタノ

ールで脱水して白色の綿毛状粉末を生じることでもでき、これは乾燥状態で保管し、後で処方することもある。収率は約82%である。

【0065】

例24

この例では、アセトン中でのEMCで活性化したCMC組成物の調製を例示する。

N-メチル-2-ピロリドン溶媒をアセトンに代えたことを除き、例23に記載の手順を繰返した。EDCを加えると、反応は例23と同様にゲル粒子を形成し、粒子を濾過によって容易に回収した。得られる生成物を水で洗浄して直ちに使用するか、またはエタノールで沈澱させ、微細な白色粉末として回収した。

【0066】

例25

この例では、エタノール中でのEMCで活性化したCMC組成物の調製を例示する。

N-メチル-2-ピロリドン溶媒をアセトンに代えたことを除き、例23に記載の手順を繰返した。結果は、例24に記載したのと実質的に同じであった。

【0067】

例26

この例では、イソプロパノール中でのEMCで活性化したCMC組成物の調製を例示する。

N-メチル-2-ピロリドン溶媒をイソプロパノールに代えたことを除き、例23に記載の手順を繰返した。結果は、例24に記載したのと実質的に同じであった。

下表1は、相当する反応生成物から調製したゲルの粘度に対する反応時間の影響を示している。生成物ゲルの粘度は、20分にわたる反応時間の増加と共に増加する。20分後に、反応生成物の粘度は急激に減少する。

【0068】

【表1】

反応時間(分)	相角度(°)	G* (Pa)	降伏応力(Pa)	粘度(cP)
5	21	199	2	17853
20	27	47	2	24479
40	29	35	2	7256
60	30	25	2	4838

【0069】

下表2は、NMP溶媒系の存在下または非存在下で行ったCMC/NAU反応についての試薬の化学量論と反応パラメーターとを示す。ゲルは、NMP溶媒中でEDCをCMCと10分間反応させることによって調製し、最終的に121℃で20分間滅菌した。反応は、上記のようにNMP溶媒ゲルの単離と並んで行った。非NMP溶媒反応生成物は、NMP反応で沈澱したほどには沈澱せず、ゲル粒子の単離は一層難しくなった。

【0070】

【表2】

パラメーター	NMP反応	非NMP反応
[CMC](%)	4.0	4.0
EDC : CMC	1.5 : 1	1.5 : 1
Rxn pH	4.25	3.81
Rxn T℃	29	29
反応時間(分)	10	10

【0071】

下表3は、NMPおよび非NMP反応についての化学組成を示す。NMP反応は、修飾が1.7倍に増加し且つ収率が1.3倍に増加したゲル生成物を生成する。

【0072】

【表3】

成分	NMP 反応	非NMP 反応
% CMC	89	81
% 尿素	5.9	3.5
% LOD	11.4	8.02
収率(%)	82	64

【0073】

図1および2は、NMP溶媒系(NMPと水との50:50混合物)を用いておよび用いずに調製したCMC/NAUゲルについての粘度および複素弾性率(ゲル強度の指標)についての熱安定性プロフィールを比較している。NMP系を用いて作成したゲルは、複素弾性率は著しく変化せず、121℃で加熱することにより粘度が漸増する。非NMP反応粉末から調製した試料は強固なゲルを形成せず、加熱により極めて速やかに融解した。

【0074】

次に、オートクレーブ処理したCMC/NAU NMPゲルを、ラット盲腸剥離モデルでの術後癒着を減少させる能力について試験した。表4の結果は、CMC/NAU NMPゲルが、未処理コントロールと比較すると、癒着の平均発生率を有意に減少させ、癒着のない動物数を増加することを示している。

【0075】

【表4】

群	N	%w/adh \geq 2	平均発生率 \pm SEM	%w/no adh
コントロール	10	60	1.5 \pm 0.5	40
CMC/NAU NMPゲル	10	20	0.4 \pm 0.3	80

【0076】

本発明のゲルは、例えば、DeBelder et al. のPCT公報第WO86/00912号に記載されているように、外科的技術分野で知られている手順の後に術後または治癒期間中に体組織の癒着または融合を防止する目的で外科手術助剤として用いることができる。外科手術中に、ゲルの1個以上の部分を適宜分離したま

まにしようとする組織間または中の位置に挿入または注入することができる。適当なアプリケーションは、侵襲を最小限にする外科手術用途で用いることができるラプロスコープ装置 (laproscopic instrument) である。ゲルは生物適合性且つ生物分解性であるので、癒着の形成を防止するのに要する時間だけ体内に留まった後、再吸収される。

【0077】

本発明のゲルは、徐放薬剤送達に用いることもできる。送達を行う薬剤は、例えば、T. J. Roseman et al., 「制御放出送達系 (Controlled Release Delivery Systems)」, (1983, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク) 中で、R. V. Sparer et al. は 第6章, 107-119頁に記載されているように、ゲルまたはフィルムに共有結合させることができ、次いで、ゲルを送達が所望な位置に移植または注入することができる。

【0078】

本発明のゲルは、眼科手術における内皮細胞の損傷を最小限にするために混濁部の除去のための水晶体超音波吸引術のような粘弾性補足物にも用いることができる。

【0079】

他の態様

他の態様は、特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

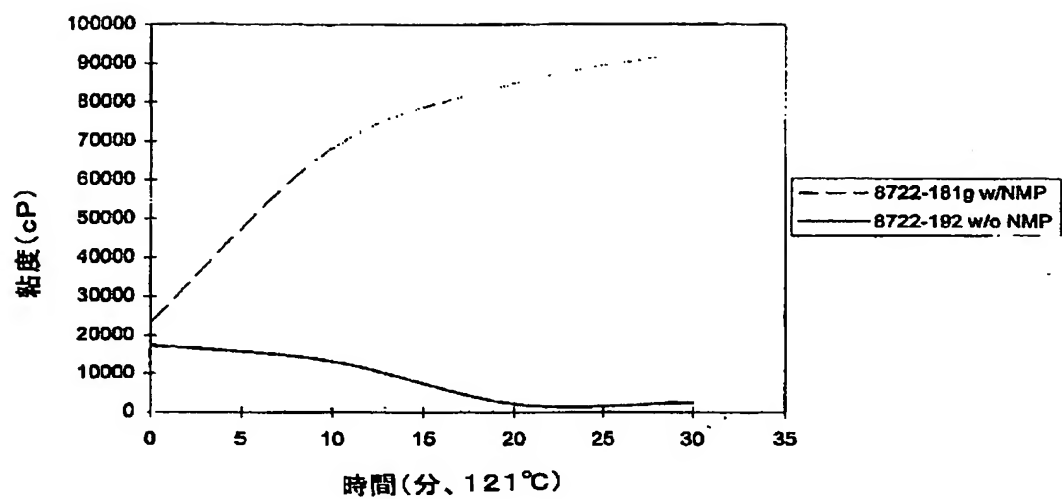
【図1】

N-メチル-2-ピロリドンを用いるおよび用いないN-アシル尿素で修飾したCMCゲルの熱処理中の粘度変化を示すグラフ。

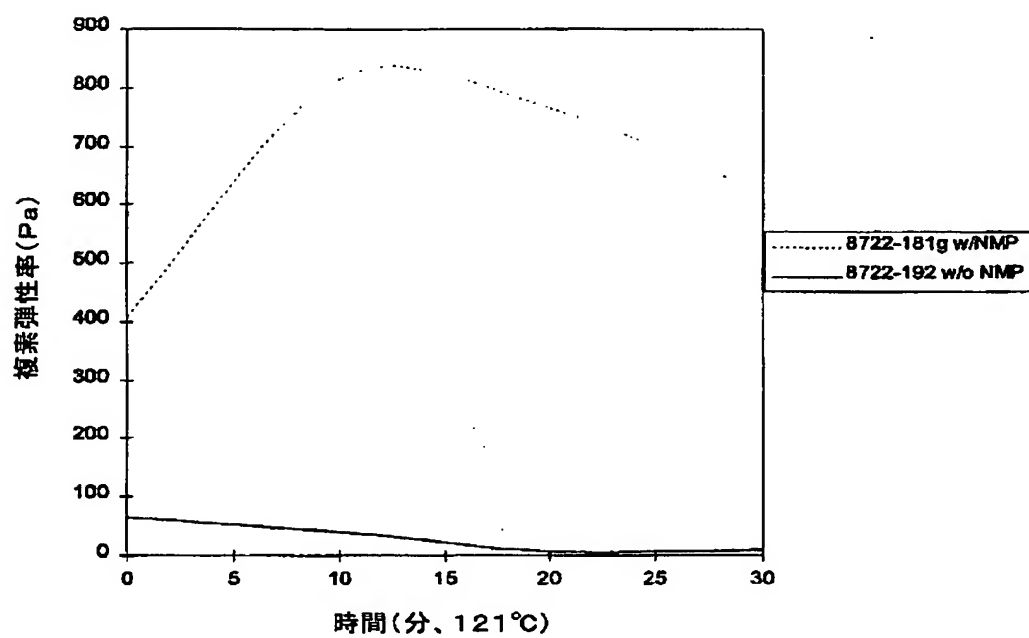
【図2】

N-メチル-2-ピロリドンを用いるおよび用いないN-アシル尿素で修飾したCMCゲルの熱処理中の複素弾性率の変化を示すグラフ。

【図1】



【図2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/35290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C08B37/00	C08B11/20 C08B37/08 C08J3/075 A61L31/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C08B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 199524 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1995-182988 XP002167063</p> <p>"Crosslinking hyaluronic acid deriv. - using carbodiimide or di- or polyepoxy cpd., used in slow-release formulations and for forming composites with reinforcing materials or high mol. drugs." & JP 07 102002 A (GUNZE KK ET KAKEN PHARM CO LTD), 18 April 1995 (1995-04-18) abstract & PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 07, 31 August 1995 (1995-08-31) & JP 07 102002 A (GUNZE LTD ET AL.), 18 April 1995 (1995-04-18) abstract</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-4, 6-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 May 2001		22/05/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. JF 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mazet, J-F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/US 00/35290

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACT SERVICE, COLOMBUS, OHIO, US; Database accession no. 123:86466, "Manufacture of physiologically compatible crosslinked hyaluronic acids and its mixture" abstract	
X	EP 0 010 519 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 30 April 1980 (1980-04-30)	1-3,5-9, 14-19
Y	page 3, line 4 - line 10 page 3, line 21 - line 30 page 4, line 1 - line 13	4,19-23
Y	WO 94 02517 A (ANIKA RESEARCH INC.) 3 February 1994 (1994-02-03) abstract page 21, line 1 -page 29, line 18	4,19-23
A	WO 96 37519 A (FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS SRL) 28 November 1996 (1996-11-28)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/35290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 07102002 A	18-04-1995	NONE	
EP 010519 A	30-04-1980	WO 8000842 A	01-05-1980
		ES 484964 A	16-06-1980
		FI 793150 A	13-04-1980
		JP 55500785 T	16-10-1980
WO 9402517 A	03-02-1994	US 5356883 A	18-10-1994
		US 6096727 A	01-08-2000
		US 5502081 A	26-03-1996
		US 6013679 A	11-01-2000
WO 9637519 A	28-11-1996	IT PD950101 A	22-11-1996
		AU 6001296 A	11-12-1996

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4C076 AA09 BB21 CC03 CC19 CC29
CC31 EE30 EE32 EE37 EE59
FF31 FF68

4C081 AA14 AB11 AC04 BB01 BB04
BB06 BB07 BC02 CD011
CD021 CD052 CD061 CD071
CD081 CD091 CE01 CE02
DA12

4C090 AA03 AA05 AA09 BA28 BA47
BA62 BA66 BA67 BA68 BA97
BB02 BB11 BB17 BB22 BB33
BB35 BB36 BB52 BB53 BB62
BD32 BD33 BD34 DA22 DA23